

STUDI PENGARUH JENIS PELARUT TERHADAP HASIL ISOLASI DAN KADAR SENYAWA FENOLIK DALAM BIJI KACANG TUNGGAK (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) SEBAGAI ANTIOKSIDAN

Dhoni Prielananta Yulistian¹, Edi Priyo Utomo^{1*}, Siti Mariyah Ulfa¹, Eriyanto Yusnawan²

¹Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Brawijaya
Jl. Veteran Malang 65145

²Balai Penelitian Tanaman Aneka Kacang dan Umbi, Jl. Raya Kendalpayak km. 8 Malang 65101

*Alamat korespondensi, Tel: +62-341-575838, Fax: +62-341-575835
Email: epu@ub.ac.id

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh jenis pelarut terhadap kadar fenolik total dari ekstrak biji kacang tunggak beserta pengujian aktivitasnya sebagai bahan antioksidan. Uji yang digunakan meliputi kadar fenolik total termasuk didalamnya kadar flavonoid total. Pengujian aktivitas antioksidan dilakukan dengan metode 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH). Metode ekstraksi yang digunakan adalah maserasi dengan pelarut etanol, metanol, 70% etanol, 70% metanol, 80% aseton, 50% aseton, dan 0,5% asam asetat dalam 70% aseton (v/v). Hasil penelitian menunjukkan bahwa 80% aseton merupakan pelarut yang dapat mengekstrak senyawa fenolik paling besar dan memiliki aktivitas antioksidan terbesar juga. Kadar fenolik total dan flavonoid total yang dihasilkan mencapai 8.081,4 EAG/g sampel dan 33.308,3 EK/g sampel, sedangkan aktivitas antioksidan yang terukur mencapai 620,9%. Dengan demikian dapat disimpulkan bahwa kepolaran pelarut mempengaruhi kadar senyawa fenolik yang terekstrak dan aktivitas antioksidan.

Kata kunci: antioksidan, kacang tunggak, variasi pelarut, fenolik total.

ABSTRACT

The aims of this research were to investigate the effect of different solvents on total phenolic compounds and antioxidant activities of cowpea seed extracts. Total phenolic compounds including total flavonoid were investigated. Antioxidant activity was determined using 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazil (DPPH) free radical scavenging. The solvents employed to extract the seed were ethanol, methanol, 70% ethanol, 70% methanol, 80% acetone, 50% acetone, and 70% acetone containing 0.5% acetic acid using maceration extraction. The result showed that 80% acetone was suitable solvent and gave the highest amount of the total phenolic compounds and also the antioxidant activity. The total phenolic and total flavonoid contents from cowpea extract were 8,081.43 mg GAE/g and 33,308.3 mg QE/g sample, respectively. Moreover, the total antioxidant activity was about 620.9%. These results suggested that the solvent polarity had significant effects on the total phenolic contents and antioxidant activity. Thus, the correlation between total phenolic contents and antioxidant activities were also well observed.

Keywords: antioxidant, cowpea, solvents variation, total phenolic.

PENDAHULUAN

Kacang tunggak (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) merupakan tanaman yang tumbuh di daerah tropis, termasuk di Indonesia [1]. Kacang tunggak mampu tumbuh pada tanah yang bersifat asam, tahan terhadap hama serta kekeringan [2]. Secara umum, biji kacang tunggak dimanfaatkan sebagai pengganti kedelai untuk membuat tempe [3].

Kacang tunggak merupakan sumber nutrisi yang baik bagi tubuh karena mengandung protein, mineral, serta karbohidrat [1]. Selain itu, kacang tunggak mengandung sejumlah senyawa dari golongan fenolik (asam galat, asam ferulat, dan asam *p-kumarat*) serta flavonoid dari kelas flavonol (kuersetin dan mirsetin) dan antosianidin (sianidin dan delphinidin) yang dapat dimanfaatkan sebagai antioksidan untuk menangkalkan radikal bebas [2].

Aktivitas antioksidan kuersetin dapat diketahui dari kemampuannya dalam menangkap radikal bebas. Radikal bebas adalah atom atau gugus yang memiliki elektron tak berpasangan tetapi tidak bermuatan sehingga bersifat sangat reaktif [4]. Kuersetin sebagai donor elektron dapat menghambat aktivitas radikal bebas untuk terus bereaksi karena dapat menghasilkan suatu spesi yang memiliki sifat reaktivitas lebih kecil [6].

Metode penentuan aktivitas antioksidan yang umum digunakan adalah uji aktivitas antioksidan menggunakan 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) yang dikembangkan oleh Blois (1958) [6]. Aktivitas antioksidan ditentukan sebagai berkurangnya konsentrasi radikal DPPH setelah penambahan senyawa antioksidan. Warna ungu larutan DPPH akan berkurang intensitasnya jika elektron tak berpasangan dari atom nitrogen DPPH tereduksi ketika menerima radikal hidrogen dari senyawa antioksidan. Pengurangan intensitas warna dapat ditentukan sebagai aktivitas antioksidan terhadap radikal DPPH [7].

Pada penelitian ini ekstraksi antioksidan dari biji kacang tunggak dilakukan dalam sistem pelarut yang berbeda. Hal tersebut dilakukan berdasarkan pertimbangan bahwa persentase ekstraksi dipengaruhi oleh tipe pelarut dengan berbagai kepolaran dan pH, serta komposisi kimia dan sifat fisik dari sampel. Pelarut yang sering digunakan untuk ekstraksi adalah air, aseton, etanol, dan metanol [8].

Xu dan Chang (2007) telah mengekstraksi antioksidan total tanaman dari jenis kacang-kacangan dengan cara maserasi menggunakan beberapa jenis pelarut, yaitu 80% aseton, 50% aseton, 70% aseton yang mengandung 0,5% asam asetat, 99,8% etanol, 70% etanol, dan 70% metanol (dalam volume per volume, v/v). Pada penelitian tersebut, belum dilakukan ekstraksi menggunakan sampel kacang tunggak, sehingga pada penelitian ini dilakukan ekstraksi secara maserasi terhadap biji kacang tunggak dengan menambah variasi jenis pelarut yaitu etanol.

METODE PENELITIAN

Bahan dan Alat

Bahan-bahan kimia yang digunakan dalam penelitian ini mempunyai derajat pro analisa kecuali disebutkan lain yaitu metanol, etanol, aseton, asam asetat, larutan 10% (v/v)

aluminium (III) klorida (AlCl_3), natrium karbonat (Na_2CO_3), natrium nitrit (NaNO_2), natrium hidroksida (NaOH), reagen Folin-Ciocalteu, 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH), dan akuades. Adapun alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah seperangkat alat Spektrofotometer UV-Vis *Shimadzu-1601*, neraca analitik *Ohaus Precision Advanced*, *sentrifuge Hettich*, dan pipet mikro kapasitas 200 μL .

Prosedur

Persiapan Sampel

Sampel adalah biji kacang tunggak varietas KT-4 yang diperoleh dari Balai Penelitian Tanaman Aneka Kacang dan Umbi Kota Malang. Biji kacang tunggak digiling, kemudian diayak hingga diperoleh ukuran 80 mesh. Selanjutnya, serbuk simplisia dimasukkan ke dalam wadah plastik dan disimpan dalam lemari pendingin dengan temperatur 4 °C.

Ekstraksi Senyawa Fenolik dengan Perbedaan Pelarut

Serbuk simplisia sebanyak 0,5 gram dimaserasi dalam 10 mL pelarut dengan variasi yaitu 80% (v/v) aseton, 50% (v/v) aseton, 0,5% asam asetat dalam 70% (v/v) aseton, 99,9% (v/v) metanol, 70% (v/v) metanol, 99,8% (v/v) etanol, dan 70% (v/v) etanol selama 18 jam. Hasil ekstraksi disentrifugasi dan maserat dipisahkan dari residu lalu ditampung dalam wadah yang telah diberi label.

Uji Kadar Fenolik Total secara Spektrofotometri

Kadar fenolik total sampel ditentukan menggunakan reagen Folin-Ciocalteu dengan asam galat sebagai standar. Ekstrak sampel sebanyak 10 μL dicampur dengan 600 μL akuades, 50 μL reagen Folin-Ciocalteu, 150 μL larutan 7% (v/v) Na_2CO_3 , dan ditambah dengan 190 μL akuades. Campuran tersebut kemudian diinkubasi pada temperatur ruang selama 2 jam. Selanjutnya, absorbansi larutan diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada λ maksimum 765 nm dengan semua reagen tanpa sampel sebagai blanko. Kadar fenolik total ditentukan sebagai ekuivalen asam galat sesuai kurva baku asam galat.

Uji Kadar Flavonoid Total secara Spektrofotometri

Kadar flavonoid total ditentukan secara spektrofotometri. Ekstrak sampel sebanyak 500 μL ditambahkan ke 100 μL akuades, kemudian diikuti dengan penambahan 30 μL larutan 5% (v/v) NaNO_2 , 60 μL larutan 10% (v/v) AlCl_3 , 200 μL larutan NaOH 1M, dan 110 μL akuades. Absorbansi larutan diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada λ maksimum 510 nm dengan blanko larutan campuran tanpa sampel. Kadar flavonoid total diukur sebagai ekuivalen kuersetin standar berdasarkan kurva baku kuersetin.

Uji Aktivitas Antioksidan Total dengan DPPH secara Spektrofotometri

Ekstrak biji kacang tunggak diambil sebanyak 50 µL kemudian ditambahkan ke dalam 950 µL larutan DPPH. Larutan campuran diinkubasi selama 90 menit. Selanjutnya, larutan diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada λ maksimum DPPH. Aktivitas antioksidan dihitung berdasarkan persamaan (1). Aktivitas antiradikal sampel diukur sebagai ekuivalen BHT menggunakan kurva kalibrasi BHT terhadap DPPH.

$$\text{aktivitas antiradikal} = 100 \times \left(1 - \frac{\text{absorbansi sampel}}{\text{absorbansi kontrol}}\right) \quad (1)$$

HASIL DAN PEMBAHASAN

Isolasi Senyawa Fenolik dari Biji Kacang Tunggak (*Vigna unguiculata*)

Sampel biji kacang tunggak dalam bentuk serbuk dimaserasi dengan menggunakan variasi pelarut untuk mengetahui kemampuan pelarut dalam menarik metabolit sekunder. Selama proses isolasi berlangsung dua interaksi yang terjadi antara pelarut dan metabolit sekunder adalah gaya van der Waals dan ikatan hidrogen. Ikatan hidrogen akan terjadi antara atom oksigen yang memiliki pasangan elektron bebas dari senyawa fenolik dengan atom hidrogen pelarut maupun sebaliknya. Fenolik yang masih terikat dengan molekul gula pada biji kacang tunggak yang bersifat polar akan cenderung lebih larut pada pelarut yang telah diencerkan dengan akuades. Karena glikosida yang terikat tersebut memiliki kelarutan yang baik dalam air, maka jika dibandingkan dengan yang masih dalam keadaan murni, jenis pelarut yang telah diencerkan dengan akuades akan mampu mengekstrak senyawa fenolik dengan jumlah lebih banyak. Gaya van der Waals terjadi antara atom karbon pelarut dengan atom oksigen atau karbon sampel sesuai jarak van der Waals-nya.

Kadar Fenolik Total

Kadar fenolik total ekstrak kacang tunggak disajikan pada Tabel 1.

Tabel 1. Pengaruh perbedaan pelarut terhadap kadar fenolik total biji kacang tunggak

Pelarut (v/v)	Fenolik total ekuivalen asam galat (EAG)	
	mg EAG/g	mg EAG/100 g
Etanol	797,3	79730,0
Metanol	959,2	95920,0
70% etanol	1970,3	197030,0
70% metanol	1757,6	175760,0
80% aseton	8081,4	808140,0
50% aseton	3565,6	356560,0
0,5% asam asetat dalam 70% aseton	6324,3	632430,0

Ekstrak biji kacang tunggak dengan kadar fenolik tertinggi dijumpai pada ekstrak dalam 80% aseton, sedangkan kadar terendah pada ekstrak dalam pelarut etanol. Fenolik yang terikat dengan molekul gula pada posisi 3-O-glikosida akan cenderung larut dalam pelarut polar. Selain itu, ikatan hidrogen antara atom O dari aseton dengan atom H dari gugus hidroksil senyawa fenolik terglisosilasi juga mempengaruhi kelarutan. Adanya gugus metil yang merupakan pendorong elektron menyebabkan atom O menjadi kaya elektron. Dengan demikian interaksi hidrogen dengan senyawa fenolik menjadi lebih mudah. Meskipun hal yang sama terjadi pada 50% aseton, namun dengan banyaknya air yang ada, kemungkinan interaksi hidrogen cenderung terjadi antara aseton dengan air. Pada metanol dan etanol, atom H pada pelarut akan mengurangi kemungkinan interaksi hidrogen dengan sampel karena lebih kuat berinteraksi dengan atom O pada molekulnya sendiri. Hal ini akan mengurangi kesempatannya dalam berikatan hidrogen dengan atom H dari gugus –OH senyawa fenolik sampel.

Kadar Flavonoid Total

Untuk mengetahui potensi kacang tunggak sebagai salah satu sumber penghasil antioksidan, maka dilakukan uji kadar flavonoid total dan hasilnya ditunjukkan pada Tabel 2.

Tabel 2. Pengaruh perbedaan pelarut terhadap kadar flavonoid total biji kacang tunggak

Pelarut (v/v)	Flavonoid total ekuivalen kuersetin (EK)	
	mg EK/g	mg EK/100 g
Etanol	6630,8	663080,0
Metanol	7555,8	755580,0
70% etanol	6847,5	684750,0
70% metanol	3855,8	385580,0
80% aseton	33308,3	3330830,0
50% aseton	6889,2	688920,0
0,5% asam asetat dalam 70% aseton	22475,0	2247500,0

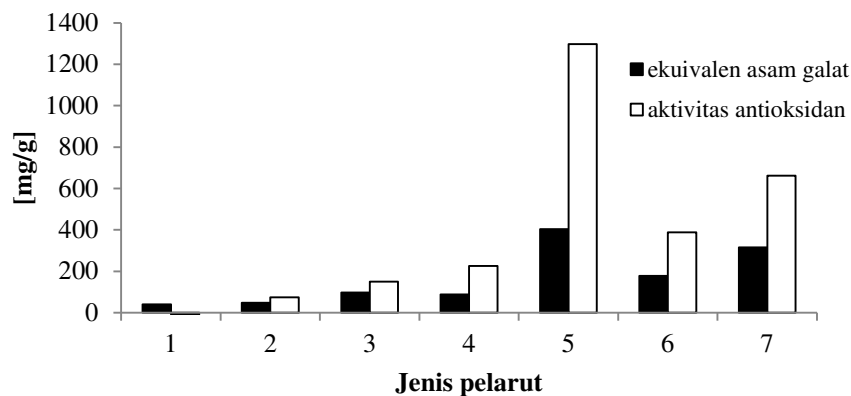
Kadar flavonoid total terbesar terdapat pada ekstrak dalam 80% aseton. Sesuai dengan uji sebelumnya, kelarutan flavonoid dipengaruhi oleh adanya ikatan O-glikosida. Oleh karena flavonoid merupakan bagian dari senyawa fenolik alam, maka data uji kadar flavonoid total menunjukkan bahwa ekstrak dalam 80% aseton memiliki kandungan paling tinggi dan ekstrak etanol memiliki nilai paling rendah. Hal tersebut menunjukkan hubungan bahwa senyawa flavonoid yang terekstrak tidak berbeda dengan senyawa fenolik.

Uji Aktivitas Antioksidan dengan Metode DPPH

Data hasil uji antioksidan total dengan metode DPPH disajikan pada Tabel 3.

Tabel 3. Pengaruh perbedaan pelarut terhadap aktivitas antioksidan biji kacang tunggak

Pelarut (v/v)	Aktivitas antioksidan	Antioksidan total ekuivalen BHT (EB)	
		mg EB/g	mg EB/100g
Etanol	-4,4	-172,0	-17200,0
Metanol	35,3	1482,7	148270,0
70% etanol	69,2	3000,0	300000,0
70% methanol	105,4	4506,7	450670,0
80% aseton	620,9	25973,3	2597330,0
50% aseton	183,8	7773,3	777330,0
0,5% asam asetat dalam 70% aseton	314,8	13226,7	1322670,0



Gambar 1. Diagram batang hubungan antara jenis pelarut, kadar fenolik total, dan aktivitas antioksidan. 1) Etanol; 2) Metanol; 3) 70% Etanol; 4) 70% Metanol; 5) 80% Aseton; 6) 50% Aseton; 7) 0,5% Asam Asetat dalam 70% Aseton

Berdasarkan data yang diperoleh, aktivitas antioksidan paling tinggi terdapat pada ekstrak dalam pelarut 80% aseton. Hal tersebut menunjukkan bahwa semakin banyak senyawa fenolik yang terekstrak, maka semakin besar aktivitas antioksidan yang dimiliki sebagaimana tersaji pada Gambar 1. Pada Tabel 3 terdapat data aktivitas antioksidan yang bernilai negatif yaitu pada ekstrak dalam etanol. Hal tersebut kemungkinan merupakan pro oksidan yang terjadi karena radikal DPPH memicu reaksi berantai terhadap sampel yang terekstrak di dalamnya. Selain itu, bisa juga disebabkan adanya suatu senyawa lain yang terekstrak dan tidak memiliki kemampuan untuk beresonansi. Kadar senyawa fenolik yang sedikit jika dibandingkan dari ekstrak lain tidak mampu untuk mencegah reaksi berantai hingga tahap propagasi atau terminasi.

KESIMPULAN

Pelarut paling efektif yang mampu mengekstrak senyawa fenolik dengan kadar paling tinggi sebesar 80841,4 mg EAG/g sampel adalah 80% (v/v) aseton. Pelarut yang dapat mengekstrak senyawa fenolik dengan kadar paling rendah yaitu 797,3 mg EAG/g sampel adalah etanol. Aktivitas antioksidan sebesar 25973,3 mg EB/g sampel berbanding lurus dengan kadar senyawa fenolik yang terekstrak yaitu ekstrak dalam 80% aseton.

DAFTAR PUSTAKA

1. Mokgope, L. B., 2006, *Cowpea Seed Coats and Their Extracts: Phenolic Compositions and Use as Antioxidants in Sunflower Oil*, Disertasi, Department of Food Science, Faculty of Natural and Agricultural Sciences, University of Pretoria, South Africa
2. Ningsih, W., 2007, *Evaluasi Senyawa Fenolik (Asam Ferulat dan Asam p-Kumarat) pada Biji, Kecambah, dan Tempe Kacang Tunggak (Vigna unguiculata)*, Skripsi, Departemen Teknologi Pertanian, Fakultas Teknologi Pertanian, Institut Pertanian Bogor, Bogor
3. Sariah, J. E., 2010, *Enhancing Cowpea (Vigna unguiculata L.) Production through Insect Pest Resistant Line in East Africa*, Thesis, Department of Agriculture and Technology, Faculty of Life Sciences, University of Copenhagen, Copenhagen
4. Bhagwat, S., D. B. Haytowitz, dan J. M. Holden, 2012, *USDA Database for the Flavonoid Content of Selected Foods*, U. S. Department of Agriculture, Maryland
5. Rajaki, O., 2012, *Isolasi Senyawa Xanton dari Kulit Buah Manggis (Garcinia mangostana L.) dan Uji Aktivitasnya sebagai Antiradikal Bebas Menggunakan Resonansi Spin Elektron*, Skripsi, Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Brawijaya, Malang
6. Kedare, S. B., dan R. P. Singh, 2011, Genesis and Development of DPPH Method of Antioxidant Assay, *Journal Food Science Technology*, 48, 412-422
7. Scherer, R., dan A. T. Godoy, 2009, Antioxidant Activity Index (AAI) by the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl Method, *Food Chemistry*, 112, 654-658, Elsevier
8. Xu, B. J., dan S. K. C. Chang, 2007, A Comparative Study on Phenolic and Antioxidant Activity of Legumes as Affected by Extraction Solvents, *Journal of Food Science*, 72, 159-166